家蚕神经肽及其受体的功能和信号转导机制研究进展

李晓童, 时连根*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘要: 神经肽是一类由神经分泌细胞分泌、用于调节生物胞间信号传递的信号分子,其信号分子的膜定位、相应胞内信使的激活以及一系列级联反应的引发,是由存在于细胞表面的特异性受体分子来完成的。神经肽及其受体能够调控昆虫的几乎所有生命活动,在昆虫生长发育中起着关键作用。家蚕 *Bombyx mori* 作为鳞翅目昆虫的模式物种,是昆虫生长发育与生理学研究的重要模型。特别是家蚕基因组测序完成后,越来越多的家蚕神经肽及其受体被鉴定,并发现其在家蚕的生长发育、取食消化、蜕皮、滞育、繁殖、吐丝结茧等各种生理活动中都发挥了重要的调节作用。本文综述了家蚕重要神经肽的种类及其对家蚕取食消化、蜕皮变态、生殖发育等的调控作用,探讨了神经肽通过结合特异性受体而激活细胞内 ERK、TOR 等下游信号通路的分子作用机制,以期为昆虫神经肽及其受体研究提供借鉴和参考,并以此推进家蚕功能基因的研究,促进蚕丝产业的发展。

关键词: 家蚕; 神经肽; G 蛋白偶联受体; 分子作用机制; 信号转导

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2016)07-0759-08

Progress in functions and underlying signal transduction mechanisms of neuropeptides and their receptors in the silkworm *Bombyx mori*

LI Xiao-Tong, SHI Lian-Gen* (College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: As a class of neuronal signal molecules, neuropeptides are secreted by the neurosecretory cells and play an important role during the communications of different cells. The specific receptor molecules, which are located on the cell surface, are responsible for the localization of neuropeptide molecules and the activation of corresponding intracellular messengers, and eventually trigger a series of cascade reactions. Neuropeptides also have crucial effects on the growth and development of insects, and regulate almost all life activities. As a model species of the Lepidoptera, the silkworm (*Bombyx mori*) is an important research model for insect development and physiology. Following the completion of the silkworm genome sequencing, more and more neuropeptides and their receptors in this moth have been identified. They were found to deeply influence lots of physiological activities, such as the growth and development, feeding and digestion, molting, diapause, reproduction and cocooning. In this article, we reviewed crucial neuropeptides in the silkworm and their regulation roles in feeding and digestion, molting and metamorphosis, reproduction and development, and other physiological processes. We also discussed the molecular mechanisms that neuropeptides activate the downstream signal transduction pathways, such as ERK and TOR, by binding to their specific receptors. It is expected to provide insights and references for the research of neuropeptides and their receptors in insects, so to advance the research of functional genes of the silkworm and promote the development of silk industry.

Key words: *Bombyx mori*; neuropeptides; G protein coupled receptors; molecular mechanism; signal transduction

---

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272375, 31572462, 31072090)

作者简介: 李晓童, 男, 1991 年 1 月生, 山东泰安人, 博士研究生, 研究方向为家蚕生理生化学, E-mail: lixiaotong@zju.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: slgsilk@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-03-08; 接受日期 Accepted: 2016-06-05

神经肽(neuropeptides)是一类普遍存在于动物体内的多肽分子,在动物的发育、繁殖、行为、取食等生理活动中具有关键的调控作用(Hökfelt *et al.*, 2000)。神经肽作为一类胞外信号分子,在细胞内发挥调控作用需要与细胞表面的特异性受体即神经肽受体(neuropeptides receptor, NPR)互作,对其生理功能的研究通常也是通过鉴定和分析与其互作的特异性受体来实现的。除促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone, PTTH)、类胰岛素肽(insulin-like peptide, ILP)和羽化激素(ecdysone hormone, EH)等少数神经肽的特异性受体外(Chang *et al.*, 2009; Rewitz *et al.*, 2009; Iga and Smagghe, 2011),绝大多数神经肽的受体属于G蛋白偶联受体(G protein coupled receptors, GPCRs),这些受体的共同点是立体结构中存在7个跨膜α螺旋,且肽链的C端和连接第5个和第6个α螺旋的胞内环上都有G蛋白(鸟苷酸结合蛋白)结合位点(Moreira, 2014)。

昆虫中首个鉴定到的神经肽受体是黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的类速激肽(tachykinin-like peptides)受体(Li *et al.*, 1991),此后果蝇类神经肽Y(neuropeptides Y, NPY)受体、烟草天蛾 *Manduca sexta* 利尿激素(diuretic hormone, DH)受体、蟋蟀 *Acheta domesticus* 利尿激素受体和果蝇脂动激素(adipokinetic hormone, AKH)受体等神经肽受体被相继发现(Li *et al.*, 1992; Reagan, 1994, 1996)。黑腹果蝇基因组测序完成后,基于基因组数据的受体预测方法被广泛应用,昆虫神经肽受体的鉴定速度大大加快。目前,近40种果蝇神经肽受体的功能已被成功解析,这些受体有的只能识别一种神经肽,有的可以响应多种不同的神经肽信号发挥调控作用,还有的被认为参与了神经肽信号通路,但还未发现与其互作的配体分子,此种受体被称为孤儿受体(orphan receptor)。虽然昆虫中内源性神经肽种类多种多样,但神经肽受体的进化过程是相当保守的。研究人员在其他昆虫中也发现了果蝇神经肽受体的同源编码序列,同时也发现了一些果蝇中不存在的具有种属特异性的神经肽信号通路,如冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中发现的AKH/corazonin-related peptide (ACP)信号通路(Hansen *et al.*, 2010),家蚕 *Bombyx mori* 中的促咽侧体素(allatotropin, AT)信号通路以及赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中的inotocin信号通路等(Stafflinger *et al.*, 2008; Yamanaka *et al.*, 2008)。

家蚕是一种重要的经济昆虫,有着5 000多年的驯化历史,古往今来为东西方的经济文化交流做出了突出贡献(Goldsmith *et al.*, 2005)。19世纪以来,家蚕逐渐成为生命科学研究的鳞翅目模式物种,为人类理解遗传学和分子生物学理论提供了诸多经典范例(Willis *et al.*, 1995)。家蚕遗传背景清晰,突变基因资源丰富,而与果蝇相比其分化程度更高、体积更大,这些特点使家蚕成为研究动物发育与信号转导机制的优质素材。特别是家蚕基因组测序完成后,家蚕功能基因研究进入了一个崭新的阶段,家蚕生长发育、滞育与变态、产丝调控和性别决定等分子机理被逐步阐释(Xia *et al.*, 2014)。相比于果蝇、小鼠 *Mus musculus* 等模式物种,家蚕中神经肽及其受体的研究起步较晚,近几年不断有新的家蚕神经肽及其受体被发现和研究。本文综述了近年来家蚕神经肽及其受体的研究进展,以期为昆虫神经肽及其受体家族的研究提供背景资料,同时为家蚕功能基因组研究提供新的思路。

1 家蚕神经肽及其受体的种类

神经肽作为昆虫体内种类最多、功能最复杂的信号分子之一,是由神经分泌细胞分泌的,这些细胞主要位于大脑、咽下神经节等处。在家蚕中鉴定到的首个神经肽是一种家蚕素/胰岛素相关肽4K-PTTH-II(Nagasawa *et al.*, 1986),此后随着家蚕基因组测序完成,越来越多的神经肽序列被克隆。Roller等(2008)通过分子克隆和同源分析的方法,从家蚕基因组中鉴定到23种家蚕神经肽,以及促肾上腺皮质激素释放因子样利尿激素(corticotropinreleasing factor-like diuretic hormone, CRF-like DH)、降钙素样利尿激素(calcitonin-like diuretic hormone, CT-like DH)和capability (CAPA)等3个神经肽的不同剪接异构体。甘玲等(2010)通过神经肽基因筛查和成熟肽预测等方法,从家蚕中检测到31个神经肽家族的共44个神经肽基因,预测出193个成熟的神经肽,其中73个发生了C端酰胺化,9个发生了酪氨酸的硫酸化,6个发生了N端环化。研究表明,家蚕具有昆虫中已发现的几乎所有种类的神经肽,且特征基序高度保守,但成熟神经肽的氨基酸序列具有一定的种属特异性。家蚕神经肽前体一般由90~250个氨基酸残基组成,成熟后一般包括3~50个氨基酸残基。

神经肽进入细胞内发挥调控作用必须依赖于细

胞膜表面的神经肽受体，家蚕中的神经肽受体大多属于 G 蛋白偶联受体（G-protein coupled receptors, GPCRs）家族。根据神经肽（配体）不同，家蚕神经肽受体可分为 18 类，即抑咽侧体素受体（allostatin receptor, ASTR）、促咽侧体素受体（allatotropin receptor, ATR）、促卵泡激素/促甲状腺激素/促黄体激素样（follicle-stimulating hormone/thyroid stimulating hormone/luteotropic hormone-like, FSH/TSH/LH-like）受体、sulfakinin 受体、myosuppressin 受体、滞育激素受体（diapause hormone receptor）、AKH/corazonin/ACP 受体、NPY 受体（NPY receptor, NPYR）、神经肽 F 受体（neuropeptide F receptor, NPFR）、速激肽相关肽受体（tachykinin-related peptides receptor, TKRPR）、白细胞激肽受体、CAPA 受体、甲壳动物心脏活性肽（crustacean cardioactive peptide, CCAP）受体、信息素生物合成激活肽受体（pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor, PBANR）、蜕皮触发激素受体（ecdysis triggering hormone receptor, ETHR）、SIFamide 受体、FMRFamide 受体以及孤儿受体（Fan *et al.*, 2010）。与双翅目昆虫（果蝇、按蚊等）和膜翅目昆虫（蜜蜂等）相比，家蚕神经肽受体的种类比较保守，但是通过基因组序列比对分析发现，家蚕中 3 种神经肽受体在进化过程中发生了特异性复制事件：神经短肽受体（short NPF receptor, sNPFR）能特异性与 sNPF 结合，在果蝇和按蚊中只存在 1 条编码序列，而在家蚕中通过复制产生了 3 条编码序列（*BNGR-A7*, *A10* 和 *A11*）；ACP 受体的结构介于 AKH 受体（AKH receptor, AKHR）和 corazonin 受体（corazonin receptor, CrzR）之间，在按蚊基因组中只存在一个，而在家蚕基因组中复制产生了两个同源基因（*BNGR-A28* 和 *BNGR-A29*）；果蝇中 myosuppression 样孤儿受体 CG13229 的同源编码基因在家蚕中也发生了复制，产生了两个同源基因（Fan *et al.*, 2010）。

2　家蚕神经肽及其受体的生理功能

神经肽在家蚕体内含量很低但活性很高，由神经分泌细胞分泌后与靶细胞表面受体结合，参与了家蚕的取食与消化、蜕皮与变态、滞育、生殖、代谢等多种调节过程，是家蚕生命活动的重要调控因子。

2.1　在家蚕取食与消化中的调控作用

家蚕的取食行为与物理、化学和营养等多种因素有关，是一种复杂的活动，交感神经系统是取食行为的主要调控者。多种神经肽在神经分泌细胞中分泌产生后被运输到交感神经系统表达，调节家蚕取食和消化过程。myosuppressin 是一种 C 端具有 FMRF 酰胺结构的神经肽，因对昆虫内脏肌肉活动的抑制性作用而得名。家蚕中的同源基因 *Bommyosuppressin*（*BMS*）通过降低肠道肌肉收缩频率，延长首次进食的潜伏期而抑制取食，而 BMS 的同源体 BMS-2 能够使家蚕的进食行为终止（Nagata *et al.*, 2011）。BMS 和 BMS-2 作为脑-肠调节神经肽，可能是通过调节其他激素的分泌来控制家蚕取食和消化的。与之类似，家蚕幼虫注射 AT 或 AT 类似多肽同样会使家蚕取食的潜伏期延长，抑制家蚕取食（Nagata *et al.*, 2012a）。速激肽（tachykinin, TK）广泛存在于家蚕的大脑中，给家蚕 5 龄幼虫注射适当浓度 TK 后能够显著缩短首次进食的潜伏期，促进家蚕取食（Nagata *et al.*, 2011）。sNPF 前体通过翻译后剪切，产生了 3 种 sNPF 小肽，实验发现家蚕脑中 sNPF 的表达受到取食状态的影响，饥饿会导致 sNPF 表达水平的下调，而注射 sNPF 会引起家蚕食桑量的增多；此外，sNPF 受体（BNGR-A10）的转录水平也与食物刺激关系密切，进食过程中移除桑叶会导致 sNPF 受体表达量下调（Nagata *et al.*, 2012b）。Deng 等（2014）利用 RNAi 技术降低 NPFR 表达量后，发现家蚕体重显著下降，食桑量降低，证明 NPFR 介导的 NPF 信号在家蚕幼虫取食和生长调控中发挥了重要作用。He 等（2014）通过 RNAi 技术使 TKRPR 表达水平下降，发现与 NPF 信号类似，会导致家蚕体重降低，说明 TKRP 通过结合 TKRPR 分子，参与了家蚕取食和消化的调控过程。最近在家蚕中鉴定到一种 RYamide 样神经肽编码基因，该基因主要表达于家蚕幼虫、蛹和成虫中肠前部的肠内分泌细胞中，该神经肽很可能通过结合受体 BNGR-A19 和 BNGR-A22 参与了家蚕取食和消化的调节过程（Roller *et al.*, 2016）。

2.2　在家蚕蜕皮与变态中的调控作用

家蚕需要通过蜕皮与变态来适应生长发育的需要，神经肽是家蚕蜕皮与变态的重要调控因子。蜕皮的发生主要由 ETH、蜕皮激素（ecdysone）、EH 和保幼激素（juvenile hormone, JH）来控制。PTTH 是一类由大脑分泌的神经肽类激素，家蚕中 PTTH 分泌后能够促进催化蜕皮激素前体合成的合成酶基因（*Halloween*）的表达（Ishizaki and Suzuki, 1994），引发家蚕蜕皮。Yamanaka 等（2011）发现，脑-肠神经肽 orcokinins 也能通过刺激前胸腺分泌 ecdysone 来

促进家蚕蜕皮。另一类神经肽——FXPRL 酰胺样神经肽(pyrokinin/PBAN)在家蚕 5 龄幼虫后期能够通过激活 ecdysone 受体来调控蜕皮发生(Watanabe *et al.*, 2007)。Iga 等(2014)通过下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS),筛选到 BNGR-B2 受体可能参与了家蚕 ecdysone 的合成过程,并证明体色分散因子(pigment dispersing factor, PDF)神经肽是 BNGR-B2 的配体,二者互作能通过与 PTTH 类似的方式激活 ecdysone 的分泌。此外,利用 RNAi 技术干扰 TKRPR 表达会导致家蚕蜕皮提前,说明 TKRPR 介导的 TKRP 信号通路参与了家蚕蜕皮行为的调节,但具体的调节机制仍不清楚(He *et al.*, 2014)。家蚕素较长时间处理 PG 后也能促进 PG 中蜕皮激素的合成,并呈现出家蚕素的浓度依赖性(Gu *et al.*, 2015)。还有研究发现,PTTH 与受体结合后能够迅速激活线粒体产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),抗氧化剂处理不仅抑制 ROS 的产生,还能够阻断 PTTH 诱导的蜕皮激素合成,证明 ROS 信号参与了 PTTH 对家蚕蜕皮激素合成的调控过程(Hsieh *et al.*, 2013)。除了促进 ecdysone 分泌的神经肽, Hua 等(1999)发现一种具有 AWQDLNSAW 酰胺结构的神经肽能够拮抗 PTTH 对 ecdysone 合成的促进作用并抑制前胸腺合成 ecdysone, 故将其命名为抑前胸腺肽(prothoracicostatic peptide, PTSP)。Yamanaka 等(2005)发现,BMS 在大脑中合成后能够作用于前胸腺中的受体 BMSR,调节家蚕前胸腺活动,抑制 ecdysone 的分泌。

家蚕中 *eth* 基因在蜕皮前 1 - 2 d 受到蜕皮激素刺激后能够表达并产生 pre-ETH 和 ETH 两种活性神经肽,随后两种神经肽会被释放到血液中激活中枢神经系统中的 ETH 受体(ETHR)并启动蜕皮相关基因表达(Žitňan *et al.*, 2007)。家蚕中 ETHR 也有两种形式,即 ETHR-A 和 ETHR-B,ETHR-A 表达于产生抑制或(和)激活性神经肽的神经元中,以响应 ETH 介导的蜕皮信号,而 ETHR-B 在心侧体(corpora cardiac, CC)中表达量较高,可能存在有其他的功能(Yamanaka *et al.*, 2008)。ETH 的释放受到 corazonin 神经肽的调控,蜕皮起始前被释放到血液中的 corazonin 在极低浓度时能引发 ETH 的分泌,但在高浓度时会通过抑制 ETH 的分泌而推迟家蚕的蜕皮时间(Tanaka *et al.*, 2002)。

JH 是一种由咽侧体(corpora allata, CA)分泌的萜烯类激素,在幼虫期与 EH 协同调节家蚕蜕皮的发生。在 JH 的分泌过程中,AST 和 sNPF 抑制 JH 生物合成相关酶类的表达,并通过血淋巴或神经网络在特定时间作用于前胸腺等特定腺体来抑制 JH 的合成和释放(Kaneko and Hiruma, 2014)。烟草天蛾等昆虫中的 AT 能够促进 JH 的释放,而家蚕幼虫期 JH 分泌调节的不同之处在于 AT 通过结合 CC 中特异表达的受体,激活 sNPF 的表达,从而抑制 JH 的合成,引起家蚕发生蜕皮(Kaneko and Hiruma, 2014)。另外,5 龄幼虫末期 JH 合成量降低是导致家蚕蛹期变态发育的关键因素,在此过程中 sNPF 受 AT 激活后能够与 AST-C 协同抑制 JH 生物合成,使家蚕完成幼虫期发育进入蛹期(Kaneko and Hiruma, 2014)。

2.3 在家蚕生殖和发育中的调控作用

PBAN 是一种咽下神经节分泌的由 33 个氨基酸残基组成的短肽,其 C 端发生了酰胺化,能够直接作用于外激素腺(pheromone gland)细胞,激活昆虫性激素的合成和分泌(Rafaeli, 2009)。PBAN 在不同物种中对性激素合成的调控方式不同,在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中,PBAN 能够激活脂肪酸合成的酶促反应,特别是乙酰辅酶 A 羧化酶活性;而在家蚕中,合成后分泌到血淋巴中的 PBAN 能够通过体液循环直接调节脂酰基还原的最后一步反应。家蚕素(bombyxin)是无脊椎动物中发现的第一种胰岛素样神经肽,在家蚕大脑中表达,能够作用于卵巢细胞膜上的家蚕素受体,并能在体外培养的家蚕卵巢中诱导减数分裂;家蚕中另一种类胰岛素样肽(IGF-like peptide, ILP)主要由脂肪体产生,并在蛹期-成虫期释放,能够作为一种生长激素调控家蚕成虫组织发育。此外,Okamoto 等(2011)发现,受到 ecdysone 刺激后家蚕卵巢管鞘中也能够表达 ILP, ILP 在卵黄形成早期具有调控卵巢发育的功能。以上现象表明,bombyxin 和 ILP 均具有促进卵巢发育和分化的潜在功能(Orikasa *et al.*, 1993; Swevers and Iatrou, 2003)。

滞育是昆虫受光周期、温度和食物等环境因素诱导所产生的静止状态,表现为发育的停顿和生理活动的降低。家蚕的滞育被认为是由滞育激素及其受体介导的信号传递引起的(Homma *et al.*, 2006)。家蚕中的滞育激素-性信息素合成激活肽基因(*diapause hormone-PBAN*)能够编码一个 FXPRLamide 样多肽前体,水解该多肽前体能够释放出 diapsuse hormone, PBAN 以及 α-、β-和 γ-咽下神经肽(subesophageal ganglion neuropeptides,

SGNPs）等小肽，但只有 diapsuse hormone 能够在一定的环境条件下诱导家蚕胚胎滞育（Hagino *et al.*，2010）。Shiomi 等（2015）利用 TALEN 基因组编辑方法敲除家蚕的 *diapause hormone-PBAN* 基因和滞育激素受体基因，得到的所有突变体都能够正常发育，且蜕皮和变态等过程也未出现异常，然而突变体的雌蛾在可诱导滞育发生的温度和光照条件下产下的仍然是非滞育卵，因此滞育激素介导的信号通路在家蚕滞育诱导中是必需的，并在配体-受体共进化过程中形成了高度敏感且特异的互作关系。Pyrokinins（PKs）是一种昆虫中普遍存在的神经肽，广泛参与了肌肉收缩的调控以及信息素的生物合成，有研究发现其在家蚕胚胎的滞育调控中发挥了诱导性作用（Nachman *et al.*，1993）。

2.4　在家蚕中的其他调控作用

神经肽信号在家蚕丝蛋白合成、糖类代谢以及翅扩张等过程中，同样发挥了重要作用。研究发现，corazonin 通过结合丝腺高量表达的 CrzR，抑制丝蛋白的合成，降低家蚕产丝量（Tanaka *et al.*，2002；Yang *et al.*，2013）。Ikeda 等（1993）发现注射化学合成的滞育激素，会使家蚕卵巢中海藻糖酶活性升高，该效应与内源性激素对卵巢发育的作用类似，证明滞育激素能够调控卵巢发育中的海藻糖代谢。注射 AKH 同样会导致家蚕幼虫海藻糖浓度升高，AKH 也可能介导了家蚕取食期血液海藻糖稳态的调节（Oda *et al.*，2000）。肠动肽（proctolin）是一种昆虫中普遍存在的具有 RYLPT-NH_2 序列特征的五肽，高浓度的肠动肽刺激会导致家蚕肠蠕动收缩增强，而添食低浓度肠动肽会显著降低食物消化吸收率，抑制家蚕幼虫生长（Fiandra *et al.*，2010）。鞣化激素（bursicon）是一种由腹神经节分泌的神经肽类激素，果蝇中鞣化激素能够调节表皮鞣化和翅的发育。Huang 等（2007）发现，家蚕鞣化激素主要在蛹期表达，用 RNAi 技术干扰后，家蚕翅的扩张出现异常，但表皮鞣化并未受到影响，表明鞣化激素调控昆虫翅发育的功能在家蚕中也是保守的。

3　家蚕神经肽信号通路的作用机制

家蚕神经肽作为一种特殊的调控分子，广泛存在于神经组织中，并能够释放到全身各组织器官中调节多种多样的生理功能。神经肽以前体序列的形式编码产生，在高尔基体和未成熟分泌颗粒中经过特异性酶切后，成为有活性的神经肽分子，部分神经肽还需要酰胺化、乙酰化、糖基化、磷酸化等翻译修饰过程，才能成为成熟的生物活性肽。

成熟神经肽产生后，需要被运输到特定的组织器官，有证据表明小 G 蛋白（small GTPases）Rab 参与了家蚕神经肽的运输过程（Uno *et al.*，2012）。神经肽发挥功能必须结合特异性受体，家蚕中的神经肽受体主要是 GPCRs 家族中的视紫红质样受体（A 家族），下面以家蚕 corazonin 神经肽信号为例，阐述家蚕神经肽信号通路的作用机制。corazonin 通过专一性结合细胞膜上的 CrzR（BNGR-A21）并偶联 Gαs 和 Gαq 蛋白，来激活胞内的腺苷酸环化酶而诱导第二信使 cAMP 的积累和 Ca^{2+} 的动员。胞内 cAMP 浓度升高会激活 PKA 发生磷酸化，Ca^{2+} 动员能够磷酸化 PKC，磷酸化的 PKA 和 PKC 与胞外 Ca^{2+} 一起通过作用于 MEK 分子，激活与生长发育密切相关的 ERK 蛋白，ERK 蛋白通过与下游分子互作来调节家蚕的生长、吐丝等生理功能。而在 PKA，PKC，Kurts 和 β-Arrestin 等分子的调控下，被 corazonin 激活的 CrzR 会在 5 – 10 min 内吞到细胞质并定位在内含体中，内吞发生 30 min 后又复敏返回到膜上，完成整个信号传导过程（Yang *et al.*，2013）。

其他家蚕神经肽信号通路的作用机制与 corazonin 基本类似，但也有一些差异，例如家蚕 AKH 结合 AKHR 后介导的 ERK 激活不需要 β-Arrestin 及其他调节蛋白的参与（Huang *et al.*，2010）；而另一种家蚕神经肽受体 NPFR 受到 NPF 刺激后通过偶联 Gαi 抑制胞内 cAMP 并激活胞内 Ca^{2+}，随后在 MEK1/2，phosphoinositide 3-kinase（PI3K）和 PKC 等分子的作用下介导 ERK 发生磷酸化。而在受体的内吞机制上，家蚕 NPFR 受到 NPF 激活后的内吞是通过与网格蛋白互作完成的，并且除了大部分 NPFR 分子进入内含体完成内吞外，另有小部分在溶酶体中完成内吞过程（Deng *et al.*，2014）。家蚕离子转运肽（ion transport peptide，ITP）是一类比较特殊的神经肽，它能够结合细胞膜上的两种受体——BNGR-A2 和 BNGR-A34，随后偶联 G 蛋白激活 PKA 活性，进一步参与生命活动的调节（Nagai *et al.*，2014）。

家蚕 PTTH 信号转导机制与其他 GPCRs 神经肽不同。Torso 是一种调控胚胎末期细胞命运的受体酪氨酸激酶，在家蚕 5 龄幼虫前胸腺中高量表达，Rewitz 等（2009）证明家蚕 PTTH 诱导的 ERK 磷酸化是通过结合受体 Torso 实现的。PTTH 与受体结合后，通过第二信使 cAMP 和 Ca^{2+} 激活 PKC 和钙调

蛋白,导致胞内 ERK 的磷酸化而调控 *Halloween* 基因表达(Gu *et al.*, 1996, 1998, 2010)。最新研究发现,ERK 的磷酸化会进一步导致组蛋白 H3 上 Ser10 的磷酸化,从而在基因转录和表达水平上影响 PTTH 介导的信号转导过程(Gu and Hsieh, 2015)。此外,PTTH 可以独立于 ERK 信号通路,通过激活 PI3K/Akt 信号而促进前胸腺的生长。PI3K 被 PTTH 激活后还能使 TOR 信号的下游分子 4E 结合蛋白(4E-binding protein, 4E-BP)和 p70 核糖体蛋白 S6 激酶(p70 ribosomal protein S6 kinase, S6K)发生磷酸化,从而激活前胸腺合成 ecdysone,而 TOR 激酶抑制剂雷帕霉素(rapamycin)能够抑制 PTTH 诱导的 4E-BP 和 S6K 磷酸化反应(Gu *et al.*, 2011, 2012)。尽管 TOR 信号对 ecdysone 前体合成的调控已有大量研究,但通过 PI3K 和 TOR 信号促进 ecdysone 前体合成的机制仍未完全了解,有待进一步研究。

4 小结与展望

随着家蚕基因组测序"三部曲"——家蚕基因组框架图、家蚕基因组精细图和家蚕遗传变异图的完成,以及家蚕转基因和基因组编辑等研究手段的成熟,家蚕功能基因研究进入了一个崭新的时代(Takasu *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2012, 2014; Xia *et al.*, 2014; Xu and O'Brochta, 2015)。神经肽及其受体介导的信号通路由于在生命活动调控中的基础性、多效性和复杂性,而成为家蚕功能基因研究的重点。目前,对于神经肽及其受体在蜕皮和变态、滞育以及取食行为等方面的调控研究较多,但仍存在许多问题亟待解决。

首先,目前发现的家蚕神经肽主要是根据已报道的其他生物神经肽而寻找到的同源类似物,但对于家蚕特异性神经肽仍知之甚少,寻找家蚕特异性神经肽并揭示其功能,将有助于理解家蚕发育及调控方式的特殊性,这是未来研究中所面临的重要挑战。

其次,甘玲等(2010)通过生物信息学方法共鉴定到 31 个神经肽基因家族中的 44 个神经肽基因,预测出 193 个成熟神经肽,但已确定的家蚕神经肽互作受体数目有限,这对了解神经肽的生理功能带来了阻碍。蛋白质互作研究技术与生物信息学方法的结合,将帮助我们鉴定到更多的家蚕神经肽受体,并在此基础上理解神经肽的胞内信号转导过程。

第三,昆虫神经肽数目众多,且一种神经肽可以参与多个生理过程的调节,因此在不同组织器官中研究神经肽功能的多效性,将增进我们对家蚕各器官调控的差异性和一致性的理解。

第四,随着结构生物学的发展,解析神经肽与其受体的结构,研究其结构与活性的构效关系,将成为新的热点。这方面的研究将使我们从根本上认识神经肽的调控方式,并通过对神经肽及其受体的结构改造来发挥更有针对性的功能。

家蚕作为鳞翅目昆虫生长发育和分子生物学研究的模式生物,揭示其神经肽及其受体介导的分子调控机制,将为我们认识昆虫营养信号传导与变态发育调控等科学问题提供有益借鉴,同时将为以昆虫神经肽为靶标进行害虫控制提供新的线索和理论基础。

参考文献(References)

Chang JC, Yang RB, Adams ME, Lu KH, 2009. Receptor guanylyl cyclases in Inka cells targeted by eclosion hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(32): 13371 - 13376.

Deng X, Yang H, He X, Liao Y, Zheng C, Zhou Q, Zhu C, Zhang G, Gao J, Zhou N, 2014. Activation of *Bombyx* neuropeptide G protein-coupled receptor A4 via a Galphai-dependent signaling pathway by direct interaction with neuropeptide F from silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 45: 77 - 88.

Fan Y, Sun P, Wang Y, He X, Deng X, Chen X, Zhang G, Chen X, Zhou N, 2010. The G protein-coupled receptors in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(8): 581 - 591.

Fiandra L, Casartelli M, Diamante B, Giordana B, 2010. Proctolin affects gut functions in lepidopteran larvae. *J. Appl. Entomol.*, 134(9 - 10): 745 - 753.

Gan L, Liang JB, Liu XL, He NJ, 2010. Neuropeptide gene screening and mature peptide prediction in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 53(1): 9 - 19. [甘玲, 梁九波, 刘喜龙, 何宁佳, 2010. 家蚕神经肽基因的筛查及成熟肽的预测. 昆虫学报, 53(1): 9 - 19]

Goldsmith MR, Shimada T, Abe H, 2005. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Annu. Rev. Entomol.*, 50: 71 - 100.

Gu SH, Chen CH, Hsieh YC, Lin PL, Young SC, 2015. Modulatory effects of bombyxin on ecdysteroidogenesis in *Bombyx mori* prothoracic glands. *J. Insect Physiol.*, 72: 61 - 69.

Gu SH, Chow YS, Lin FJ, Wu JL, Ho RJ, 1996. A deficiency in prothoracicotropic hormone transduction pathway during the early last larval instar of *Bombyx mori*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 120(2): 99 - 105.

Gu SH, Chow YS, O'Reilly DR, 1998. Role of calcium in the stimulation of ecdysteroidogenesis by recombinant prothoracicotropic hormone in the prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(11): 861 - 867.

Gu SH, Hsieh YC, 2015. Regulation of histone H3 phosphorylation at serine 10 in PTTH-stimulated prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 57: 27 - 33.

Gu SH, Lin JL, Lin PL, 2010. PTTH-stimulated ERK phosphorylation in prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*: role of Ca^{2+}/calmodulin and receptor tyrosine kinase. *J. Insect Physiol.*, 56(1): 93 - 101.

Gu SH, Yeh WL, Young SC, Lin PL, Li S, 2012. TOR signaling is involved in PTTH-stimulated ecdysteroidogenesis by prothoracic glands in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(4): 296 - 303.

Gu SH, Young SC, Lin JL, Lin PL, 2011. Involvement of PI3K/Akt signaling in PTTH-stimulated ecdysteroidogenesis by prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(3): 197 - 202.

Hagino A, Kitagawa N, Imai K, Yamashita O, Shiomi K, 2010. Immunoreactive intensity of FXPRL amide neuropeptides in response to environmental conditions in the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res.*, 342(3): 459 - 469.

Hansen KK, Stafflinger E, Schneider M, Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Kollmann M, Schachtner J, Grimmelikhuijzen CJ, 2010. Discovery of a novel insect neuropeptide signaling system closely related to the insect adipokinetic hormone and corazonin hormonal systems. *J. Biol. Chem.*, 285(14): 10736 - 10747.

He XB, Zang JS, Li XM, Shao JJ, Yang HP, Yang JW, Huang HS, Chen LJ, Shi LG, Zhu CG, Zhang GZ, Zhou NM, 2014. Activation of BNGR-A24 by direct interaction with tachykinin-related peptides from the silkworm *Bombyx mori* leads to the Gq- and Gs-coupled signaling cascades. *Biochemistry*, 53(42): 6667 - 6678.

Hökfelt T, Broberger C, Xu ZD, Sergeyev V, Ubink R, Diez M, 2000. Neuropeptides - an overview. *Neuropharmacology*, 39(8): 1337 - 1356.

Homma T, Watanabe K, Tsurumaru S, Kataoka H, Imai K, Kamba M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma, T, 2006. G protein-coupled receptor for diapause hormone, an inducer of *Bombyx* embryonic diapause. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 344(1): 386 - 393.

Hsieh YC, Hsu SL, Gu SH, 2013. Involvement of reactive oxygen species in PTTH-stimulated ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(9): 859 - 866.

Hua YJ, Tanaka Y, Nakamura K, Sakakibara M, Nagata S, Kataoka H, 1999. Identification of a prothoracicostatic peptide in the larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 274(44): 31169 - 31173.

Huang H, He X, Deng X, Li G, Ying G, Sun Y, Shi LG, Benovic JL, Zhou N, 2010. *Bombyx* adipokinetic hormone receptor activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 via G protein-dependent PKA and PKC but β-arrestin-independent pathways. *Biochemistry*, 49(51): 10862 - 10872.

Huang J, Zhang Y, Li M, Wang S, Liu W, Couble P, Zhao G, Huang Y, 2007. RNA interference-mediated silencing of the bursicon gene induces defects in wing expansion of silkworm. *FEBS Lett.*, 581(4): 697 - 701.

Iga M, Nakaoka T, Suzuki Y, Kataoka H, 2014. Pigment dispersing factor regulates ecdysone biosynthesis via *Bombyx* neuropeptide G protein coupled receptor-B2 in the prothoracic glands of *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 9(7): e103239.

Iga M, Smagghe G, 2011. Relationship between larval-pupal metamorphosis and transcript expression of insulin-like peptide and insulin receptor in *Spodoptera littoralis*. *Peptides*, 32(3): 531 - 538.

Ikeda M, Su ZH, Saito H, Imai K, Sato Y, Isobe M, Yamashita O, 1993. Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm, *Bombyx mori*, by synthetic diapause hormone. *J. Insect Physiol.*, 39(10): 889 - 895.

Ishizaki H, Suzuki A, 1994. The brain secretory peptides that control moulting and metamorphosis of the silkmoth, *Bombyx mori*. *Int. J. Dev. Biol.*, 38(2): 301 - 310.

Kaneko Y, Hiruma K, 2014. Short neuropeptide F (sNPF) is a stage-specific suppressor for juvenile hormone biosynthesis by corpora allata, and a critical factor for the initiation of insect metamorphosis. *Dev. Biol.*, 393(2): 312 - 319.

Li XJ, Wolfgang W, Wu Y, North R, Forte M, 1991. Cloning, heterologous expression and developmental regulation of a *Drosophila* receptor for tachykinin-like peptides. *EMBO J.*, 10(11): 3221 - 3229.

Li XJ, Wu YN, North RA, Forte M, 1992. Cloning, functional expression, and developmental regulation of a neuropeptide Y receptor from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 267(1): 9 - 12.

Ma S, Chang J, Wang X, Liu Y, Zhang J, Lu W, Gao J, Shi R, Zhao P, Xia Q, 2014. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in *Bombyx mori*. *Sci. Rep.*, 4: 528.

Ma S, Zhang S, Wang F, Liu Y, Liu Y, Xu H, Liu C, Lin Y, Zhao P, Xia Q, 2012. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. *PLoS ONE*, 7(9): e45035.

Moreira IS, 2014. Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840(1): 16 - 33.

Nachman RJ, Holman GM, Schoofs L, Yamashita O, 1993. Silkworm diapause induction activity of myotropic pyrokinin (FXPRLamide) insect neuropeptides. *Peptides*, 14(5): 1043 - 1048.

Nagai C, Mabashi-Asazuma H, Nagasawa H, Nagata S, 2014. Identification and characterization of receptors for ion transport peptide (ITP) and ITP-like (ITPL) in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 289(46): 32166 - 32177.

Nagasawa H, Kataoka H, Isogai A, Tamura S, Suzuki A, Mizoguchi A, Fujiwara Y, Suzuki A, Takahashi SY, Ishizaki H, 1986. Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(16): 5840 - 5843.

Nagata S, Matsumoto S, Mizoguchi A, Nagasawa H, 2012a. Identification of cDNAs encoding allatotropin and allatotropin-like peptides from the silkworm, *Bombyx mori*. *Peptides*, 34(1): 98 - 105.

Nagata S, Matsumoto S, Nakane T, Ohara A, Morooka N, Konuma T, Nagai C, Nagasawa H, 2012b. Effects of starvation on brain short neuropeptide F-1, -2, and -3 levels and short neuropeptide F receptor expression levels of the silkworm, *Bombyx mori*. *Front. Endocrinol.* (*Lausanne*), 3: 3.

Nagata S, Morooka N, Matsumoto S, Kawai T, Nagasawa H, 2011. Effects of neuropeptides on feeding initiation in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 172(1): 90–95.

Oda Y, Uejuma M, Iwami M, Sakurai S, 2000. Involvement of adipokinetic hormone in the homeostatic control of hemolymph trehalose concentration in the larvae of *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 45(4): 156–165.

Okamoto N, Yamanaka N, Endo Y, Kataoka H, Mizoguchi A, 2011. Spatiotemporal patterns of IGF-like peptide expression in the silkmoth *Bombyx mori* predict its pleiotropic actions. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 173(1): 171–182.

Orikasa C, Yamauchi H, Nagasawa H, Suzuki A, Nagata M, 1993. Induction of oocyte-nurse cell differentiation in the ovary by the brain during the initial stage of oogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 28(3): 303–311.

Rafaeli A, 2009. Pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN): regulatory role and mode of action. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 162(1): 69–78.

Reagan JD, 1994. Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor, a member of the calcitonin/secretin receptor family. *J. Biol. Chem.*, 269(1): 9–12.

Reagan JD,1996. Molecular cloning and function expression of a diuretic hormone receptor from the house cricket, *Acheta domesticus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(1): 1–6.

Rewitz KF, Yamanaka N, Gilbert LI, O'Connor MB, 2009. The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science*, 326(5958): 1403–1405.

Roller L, Čižmár D, Bednar B, Žitňan D, 2016. Expression of RYamide in the nervous and endocrine system of *Bombyx mori*. *Peptides*, 80: 72–79.

Roller L, Yamanaka N, Watanabe K, Daubnerová I, Žitňan D, Kataoka H, Tanaka Y, 2008. The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1147–1157.

Shiomi K, Takasu Y, Kunii M, Tsuchiya R, Mukaida M, Kobayashi M, Sezutsu H, Ichida M, Mizoguchi A, 2015. Disruption of diapause induction by TALEN-based gene mutagenesis in relation to a unique neuropeptide signaling pathway in *Bombyx*. *Sci. Rep.*, 5: 15566.

Stafflinger E, Hansen KK, Hauser F, Schneider M, Cazzamali G, Williamson M, Grimmelikhuijzen CJ, 2008. Cloning and identification of an oxytocin/vasopressin-like receptor and its ligand from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(9): 3262–3267.

Swevers L, Iatrou K, 2003. The ecdysone regulatory cascade and ovarian development in lepidopteran insects: insights from the silkmoth paradigm. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(12): 1285–1297.

Takasu Y, Kobayashi I, Beumer K, Uchino K, Sezutsu H, Sajwan S, Carroll D, Tamura T, Zurovec M, 2010. Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(10): 759–765.

Tanaka Y, Hua YJ, Roller L, Tanaka S, 2002. Corazonin reduces the spinning rate in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 48(7): 707–714.

Uno T, Sakamoto K, Isoyama Y, Hiragaki S, Uno Y, Kanamaru K, Yamagata H, Takagi M, Mizoguchi A, Takeda M, 2012. Relationship between the expression of Rab family GTPases and neuropeptide hormones in the brain of *Bombyx mori*. *Histochem. Cell Biol.* 139(2): 299–308.

Watanabe K, Hull JJ, Niimi T, Imai K, Matsumoto S, Yaginuma T, Kataoka H, 2007. FXPRL-amide peptides induce ecdysteroidogenesis through a G-protein coupled receptor expressed in the prothoracic gland of *Bombyx mori*. *Mol. Cell Endocrinol.*, 273(1–2): 51–58.

Willis JH, Wilkins AS, Goldsmith MR, 1995. A brief history of Lepidoptera as model systems. In: Goldsmith MR, Wilkins AS eds. Molecular Model Systems in the Lepidoptera. Cambridge University Press, Cambridge. 1–20.

Xia Q, Li S, Feng Q, 2014. Advances in silkworm studies accelerated by the genome sequencing of *Bombyx mori*. *Annu. Rev. Entomol.*, 59: 513–536.

Xu H, O'Brochta DA, 2015. Advanced technologies for genetically manipulating the silkworm *Bombyx mori*, a model lepidopteran insect. *Proc. Biol. Sci.*, 282(1810): 20150487.

Yamanaka N, Hua YJ, Mizoguchi A, Watanabe K, Niwa R, Tanaka Y, Kataoka H, 2005. Identification of a novel prothoracicostatic hormone and its receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 280(15): 14684–14690.

Yamanaka N, Roller L, Žitňan D, Satake H, Mizoguchi A, Kataoka H, Tanaka Y, 2011. *Bombyx* orcokinins are brain-gut peptides involved in the neuronal regulation of ecdysteroidogenesis. *J. Comp. Neurol.*, 519(2): 238–246.

Yamanaka N, Yamamoto S, Zitnan D, Watanabe K, Kawada T, Satake H, Kaneko Y, Hiruma K, Tanaka Y, Shinoda T, Kataoka H, 2008. Neuropeptide receptor transcriptome reveals unidentified neuroendocrine pathways. *PLoS ONE*, 3(8): e3048.

Yang J, Huang H, Yang H, He X, Jiang X, Shi Y, Alatangaole D, Shi L, Zhou N, 2013. Specific activation of the G protein-coupled receptor BNGR-A21 by the neuropeptide corazonin from the silkworm, *Bombyx mori*, dually couples to the G(q) and G(s) signaling cascades. *J. Biol. Chem.*, 288(17): 11662–11675.

Žitňan D, Kim YJ, Zitnanova I, Roller L, Adams ME, 2007. Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 153(1–3): 88–96.

（责任编辑：袁德成）